

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

FACULDADE DE MEDICINA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS CIRÚRGICAS

**EXPRESSÃO IMUNO-HISTOQUÍMICA DAS PROTEÍNAS VEGF E
HER-2 EM BIÓPSIAS DE OSTEOSSARCOMA**

RICARDO GEHRKE BECKER

ORIENTADOR: Prof. Dr. CARLOS ROBERTO GALIA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

AGOSTO 2012

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

FACULDADE DE MEDICINA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS CIRÚRGICAS

**EXPRESSÃO IMUNO-HISTOQUÍMICA DAS PROTEÍNAS VEGF E
HER-2 EM BIÓPSIAS DE OSTEOSSARCOMA**

RICARDO GEHRKE BECKER

ORIENTADOR: Prof. Dr. CARLOS ROBERTO GALIA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

AGOSTO 2012

CIP - Catalogação na Publicação

Becker, Ricardo Gehrke

Expressão imuno-histoquímica das proteínas VEGF e
HER-2 em biópsias de osteossarcoma / Ricardo Gehrke
Becker. -- 2012.

59 f.

Orientador: Carlos Roberto Galia.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa
de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Cirúrgicas,
Porto Alegre, BR-RS, 2012.

1. Osteossarcoma. 2. Imuno-histoquímica. 3. VEGF.
4. HER-2. I. Galia, Carlos Roberto, orient. II.
Título.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à minha esposa, meus familiares, colegas e professores.

Dedico também aos meus pacientes, os quais confiaram no tratamento que tenho oferecido com carinho e empenho.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao grupo de Ortopedistas do Hospital de Clínicas de Porto Alegre e do Hospital de Câncer de Barretos-SP pela ajuda inestimável e pela parceria que possibilitou a conclusão deste trabalho.

Agradeço ao Dr. Carlos Roberto Galia, respeitável médico e orientador, que viabilizou esta dissertação de mestrado .

Agradeço à Universidade Federal do Rio Grande do Sul, por aceitar minha participação e produção de pesquisa em suas dependências.

Agradeço à secretária do PPG-Ciências Cirúrgicas, Estela Maris Emer Araripe, e ao Professor Cleber Dario Pinto Krueel pelo auxílio prestado durante este curso.

Agradeço aos membros da banca pela disponibilidade de participar desta defesa.

Enfim, agradeço a todos que se fizeram presente nesta etapa importante de minha vida acadêmica.

SUMÁRIO

SUMÁRIO	1
INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA	2
FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	6
REFERÊNCIAS	12
HIPÓTESES E OBJETIVOS	16
HIPÓTESE NULA	16
HIPÓTESE OPERACIONAL	16
OBJETIVOS	16
OBJETIVO GERAL	16
OBJETIVOS SECUNDÁRIOS	16
ARTIGO (EM PORTUGUÊS)	17
RESUMO	18
INTRODUÇÃO	19
PACIENTES E MÉTODOS	21
RESULTADOS	23
DISCUSSÃO	25
REFERÊNCIAS	28
TABELA 1	31
TABELA 2	32
LEGENDAS DAS FIGURAS	33
FIGURA 1	34
FIGURA 2	35
FIGURA 3	36
MANUSCRIPT (ENGLISH)	37
ABSTRACT	38
INTRODUCTION	39
PATIENTS AND METHODS	41
RESULTS	42
DISCUSSION	44
REFERENCES	47
TABLE 1	50
TABLE 2	51
FIGURE LEGENDS	52
FIGURE 1	53
FIGURE 2	54
FIGURE 3	55

INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

O osteossarcoma é um tumor ósseo agressivo de origem mesenquimal produtor de osteóide caracterizado por agressividade local e presença de metástases à distância. Apesar de infrequente na população em geral, é o principal tumor ósseo maligno em crianças e adolescentes. A prevalência do osteossarcoma é estimada em 5 casos para 1.000.000 de habitantes, e pode acometer qualquer osso do corpo humano (1).

A agressividade do osteossarcoma também se reflete na presença de metástases. Em torno de 35 a 45% dos pacientes apresentam metástases ao diagnóstico, principalmente em parênquima pulmonar. A sobrevida estimada é de aproximadamente 55 a 75% para pacientes não metastáticos, e de 20 a 30% para indivíduos metastáticos (2, 3). Os princípios para o tratamento do osteossarcoma modificaram-se radicalmente nos últimos 25 anos. O único tratamento disponível antes do advento da quimioterapia era o uso de cirurgias radicais com fins geralmente paliativos. Achados históricos sugerem que aproximadamente 80% dos pacientes desenvolveriam metástases pulmonares caso a quimioterapia em altas doses não fosse aplicada (2, 3).

A introdução da quimioterapia, diferentemente do aprimoramento cirúrgico, modificou de maneira radical o prognóstico de portadores de osteossarcoma. Permitiu o desenvolvimento de técnicas cirúrgicas no sistema musculoesquelético, devido à redução da massa tumoral, e possibilitou a ressecção de lesões metastáticas em pulmões. Este arsenal terapêutico permitiu um salto em termos de prognóstico, além de melhorar a qualidade de

vida dos pacientes através de ressecções mais econômicas do sítio primário (3-5).

Após a normatização da quimioterapia, iniciou-se um período de estagnação com relação à sobrevida quando analisados os mais diversos protocolos de tratamento. A partir de então, características clínicas consideradas fundamentais para o prognóstico, como a presença de metástases, resposta à quimioterapia, o tamanho do tumor, entre outras, passaram a ser estudadas mais a fundo através da biologia molecular e análise de marcadores séricos e tumorais (2, 5-12).

Marcadores tumorais testados *in vitro* e *in vivo* ofereceram uma esperança aos pesquisadores na tentativa de estratificar os pacientes quanto ao possível prognóstico e decidir qual o melhor tratamento a ser empregado. O estudo do Fator de Crescimento do Endotélio Vascular (VEGF) e do Receptor do tipo 2 do Fator de Crescimento Epidérmico Humano (HER-2) tem demonstrado resultados conflitantes na literatura quanto a esta possível estratificação em portadores de osteossarcoma (2, 6, 10-13).

O VEGF, proteína homodimérica, responsável pelo aumento da permeabilidade endotelial vascular e pela proliferação de células endoteliais evidenciou ser de valor prognóstico em alguns estudos. Resultados conflitantes em publicações diversas dividem pesquisadores com relação ao uso do VEGF para portadores de osteossarcoma; porém, pesquisas recentes sobre carcinomas gástricos (14), carcinomas colorretais (15) e tumores esofagianos (16) evidenciaram relação entre a expressão deste marcador vascular e a redução da sobrevida (2).

HER-2 é um tipo de glicoproteína transmembrana considerado como marcador biológico relacionado ao prognóstico de pacientes portadores de câncer de mama. Desde que o DNA complementar do HER-2 foi isolado há aproximadamente 25 anos, muitas pesquisas levaram a importantes descobertas no mecanismo de ação dos receptores de tirosinoquinases (RTQ), que quando mutados ou alterados, tornam-se potentes oncoproteínas (17). Em 1985, o grupo de Ullrich da Genentech descreveu a estrutura primária completa de suposto RTQ que demonstrou alto grau de homologia com o Receptor do Fator de Crescimento Epidérmico (EGFR) humano tendo sido denominado de *human EGFR-related 2*, ou HER2 . Dois anos mais tarde, Slamon *et al.* relataram que o HER2 encontrava-se amplificado em 30% dos casos de câncer de mama invasivos e, pela primeira vez, demonstraram correlação significativa entre a superexpressão de HER2, redução da sobrevida e recidiva tumoral aumentada .

Ao final da década de 90, dois estudos identificaram relação entre a superexpressão de HER-2 em biópsias de osteossarcoma e a presença de metástases, pobre resposta à quimioterapia e menor sobrevida(12, 18). No entanto, estes resultados foram contestados por outras duas publicações que demonstraram que a presença de HER-2 em biópsias de osteossarcomas prévios à neoadjuvância teria relação inversa ao do câncer de mama; ou seja, apresentaria prognóstico mais favorável quando superexpresso (10, 11).

Considerando a literatura vigente, procurou-se determinar neste estudo a prevalência imuno-histoquímica das proteínas de VEGF e HER-2 em biópsias de osteossarcoma realizadas antes de qualquer tratamento sistêmico. Como

objetivos secundários, procurou-se relacionar estes marcadores com variáveis de prognóstico como a presença de metástases, resposta à quimioterapia, idade, sexo, conclusão do protocolo de tratamento e subtipo histológico.

FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

O osteossarcoma é um dos tumores ósseos primitivos malignos mais frequentes em seres humanos. O comportamento agressivo local e o alto potencial metastático são responsáveis pela maioria dos óbitos nos primeiros anos de tratamento. A introdução da quimioterapia na década de 80 melhorou sobremaneira o prognóstico. Atualmente a resposta à quimioterapia neoadjuvante é o principal parâmetro de desfecho estabelecido. Como rotina, nos protocolos para o tratamento do osteossarcoma ainda não está estabelecido um instrumento que seja capaz de estratificar precocemente o possível potencial de progressão da doença. A aplicação de um método preditivo para progressão teria um papel importante na escolha de um tratamento individualizado em fases precoces de portadores de osteossarcoma (9).

Alguns marcadores biológicos como o VEGF, HER-2 (ErbB-2), MMP (metaloproteinase de matriz), PDGF (fator de crescimento derivado de plaquetas) e CD34 têm sido estudados com objetivo de determinar características tumorais que possam influenciar no desfecho da doença. Desse modo, permitiriam a intervenção no início do tratamento, individualizado ou não, com objetivo de aumentar a curva de sobrevida em possíveis lesões biologicamente mais agressivas .

A angiogênese é pré-requisito fundamental para o desenvolvimento de tumores sólidos, principalmente após atingirem 1 a 2 mm³ de volume. Está diretamente relacionada à disseminação de metástases, cooperando para penetração de êmbolos tumorais nos vasos sanguíneos adjacentes ao sítio

primário. A associação entre aumento da vascularização tumoral e mau prognóstico tem sido descrita em vários tipos de tumores, incluindo o câncer de mama, o carcinoma de pulmão, o adenocarcinoma de cólon, o carcinoma gástrico, os tumores esofágicos e o carcinoma de próstata (6, 19, 20).

O VEGF tem se mostrado o principal marcador biológico de angiogênese em estudos relacionados ao prognóstico no osteossarcoma. Esta proteína homodimérica foi identificada como mitógeno para células endoteliais *in vitro* e como importante promotor da angiogênese *in vivo*. VEGF ativa células endoteliais através da interação com receptores Flk-1 (VEGFR-1) e Flt-1 (VEGFR-2), expressos seletivamente no endotélio vascular. Em estudo publicado no ano de 2000, Kaya *et al.* identificaram em 27 biópsias de osteossarcoma, anteriores à quimioterapia neoadjuvante, que 63% das amostras apresentaram VEGF superexpresso à imuno-histoquímica. Oitenta e nove por cento dos indivíduos com VEGF considerado positivo apresentaram metástases, contra 10% dos com VEGF negativo. Sobrevida geral e livre de doença em 5 anos foi de 90% quando VEGF negativo, contra 18 e 38,5% para sobrevida livre de doença e geral, respectivamente, para VEGF superexpresso; $p < 0.03$ (7).

Em 1999, Lee *et al.* analisaram 30 biópsias de pacientes não metastáticos, anteriores à quimioterapia, utilizando reação de cadeia da polimerase transcriptase-reversa (RT-PCR). O RNA mensageiro de VEGF expressou-se em todas as amostras, sendo que em 80% através da isoforma VEGF165, e em 20% restantes através da isoforma VEGF121. Oitenta e três por cento dos indivíduos com VEGF165 positivo desenvolveram metástases, enquanto apenas 16% dos com VEGF165 negativos. A sobrevida geral foi

significativamente menor em indivíduos portadores da isoforma VEGF165 positiva(13).

Em 2002, novamente Kaya *et al.*, após investigarem a associação de VEGF em biópsias de osteossarcoma e a presença de metástases, publicaram artigo relacionando os níveis de VEGF séricos com a superexpressão do mesmo em 16 amostras tumorais de osteossarcoma. Não houve relação entre os níveis de VEGF séricos e o volume tumoral; no entanto, os níveis de VEGF séricos foram significativamente maiores em indivíduos que apresentaram expressão positiva do VEGF nas biópsias, quando comparados aos negativos. Concluíram que o aumento sérico de VEGF estava significativamente associado ao aumento da densidade microvascular tumoral através da análise imuno-histoquímica de CD34, à progressão da doença com metástases pulmonares, além de expressão positiva de VEGF nas amostras. Portanto, sugeriram que o aumento sérico do VEGF serviria como fator preditivo para progressão precoce da doença em osteossarcomas (6).

HER-2 é uma proteína transmembrana de 185-kilodalton codificada pelo oncogene c-erbB2 do cromossomo humano 17 que mostra similaridade estrutural e funcional com o receptor do fator de crescimento epidérmico. A superexpressão de HER-2 em amostras de câncer de mama demonstrou má resposta ao tratamento quimioterápico, desenvolvimento de metástases, além de menor sobrevida. A imuno-histoquímica é o método mais comum de detecção da superexpressão do HER-2, porém é afetada significativamente pela sensibilidade dos diversos tipos de anticorpos existentes e também pelo tipo de tecido analisado (*congelado versus fixado*). Na maioria dos estudos que utilizaram imuno-histoquímica em câncer de mama, apenas o padrão

membranoso de coloração tem sido considerado específico para a proteína HER-2 e para a expressão do seu gene. O padrão citoplasmático costuma ser considerado inespecífico; no entanto, a positividade citoplasmática tem sido relatada como fator prognóstico em artigos que envolvem câncer de bexiga, nasofaríngeo, colorretal e papilífero de tireoide (21-23). Da mesma maneira, em estudos relacionados ao osteossarcoma, todas as análises descritas até então levaram em consideração apenas características quantitativas (0, 1+, 2+, 3+) e qualitativas (ausente, fraca, moderada e forte) das amostras. Aspectos como o padrão citoplasmático e membranoso quando descritos, não foram utilizados como critério de seleção (22).

Desde a década de 90, estudos sobre HER-2 em portadores de osteossarcoma são causa de controvérsia. Amostras coletadas antes da terapia sistêmica concluíram que a superexpressão desta proteína estaria associada à presença de metástases pulmonares, a menor sobrevida, além de pobre resposta à quimioterapia (12, 18). No entanto, em 2001, Akatsuka *et al.* contrariaram esta teoria, alegando que a superexpressão do HER-2 desapareceria em pacientes que se tornaram metastáticos. Desse modo, não poderiam considerar a presença de HER-2 como fator relacionado ao prognóstico, pois a presença de metástases está diretamente associada à menor sobrevida (11).

Em 2002, Akatsuka *et al.* examinaram 81 amostras de OS onde 14 não demonstraram qualquer reatividade ao HER-2 e 16 apenas de maneira fraca (0 e 1+). Todos 30 indivíduos foram considerados negativos para HER-2, enquanto as 51 amostras restantes foram classificadas como positivas (2+ e 3+). Análise multivariada revelou que apenas a não expressão de HER-2

poderia ser considerada fator de risco independente para pobre desfecho ($RR=2.53$) através da redução da sobrevida geral e livre de doença (10).

No estudo de Onda *et al.*, a superexpressão de HER-2 nas amostras de osteossarcoma foi confirmada pelo método de imunoprecipitação e imuno-histoquímica (anticorpo CB11), porém foi analisada apenas de maneira qualitativa, e conseqüentemente transposta para o modo quantitativo em cruzes. Não foi descrita análise de porcentagem de células coradas pelo método. Além do mais, toda positividade de padrão membranoso (>1+) foi considerada significativa. Nenhum tipo de amplificação do gene c-erbB-2 ou nenhuma evidência de mutação significativa foi encontrada nestas amostras através de hibridização por southern blot (18).

Gorlick *et al.* avaliaram a coloração para HER-2 apenas pelo padrão citoplasmático, porém transpuseram o escore do anticorpo 5B5 para equiparar-se aos critérios do HercepTest®. Maior expressão do que 2+ à imuno-histoquímica com 5B5 foi considerado compatível com pelo menos 1+ do kit da DAKO. No HercepTest® (DAKO) para o câncer de mama estima-se confiabilidade para expressão citoplasmática do gene c-erbB-2 quando igual ou maior a 3+. Os resultados encontrados criaram confusão devido aos métodos escolhidos, pois diferentes tipos de anticorpos foram utilizados quando comparados aos demais estudos, além da discutível padronização dos escores para expressão dos anticorpos de HER-2 (12).

Zhou *et al.* avaliaram 22 amostras de osteossarcoma e associaram a superexpressão citoplasmática de HER-2 ao risco aumentado do desenvolvimento de metástases pulmonares (24). Maitra *et al.* utilizaram métodos de imuno-histoquímica e de confirmação molecular pelo método de

FISH em 18 pacientes portadores de osteossarcoma, mas não encontraram superexpressão significativa de HER-2 (25).

Até o presente momento, marcadores tumorais como o VEGF e o HER-2 não apresentaram valor prognóstico significativo conclusivo quanto ao OS. Existe uma tendência teórica sugerindo que a superexpressão de VEGF apresente associação com a menor sobrevida geral e livre de doença. No entanto, falhas na metodologia dos mesmos ainda colocam em dúvida atuais resultados (2, 6, 26). Com relação ao HER-2 em osteossarcoma, resultados contraditórios são justificados através de vários elementos como, por exemplo, a não padronização de anticorpos utilizados entre os diferentes estudos, a discrepância entre os métodos de fixação e armazenamento das amostras, a conversão entre escores de avaliação imuno-histoquímica, além da seleção inadequada dos pacientes (12, 27, 28).

A compreensão da estrutura e função dos genes e proteínas associados ao osteossarcoma é fundamental para o estabelecimento de métodos para o diagnóstico precoce e intervenções terapêuticas efetivas. Pesquisas que determinem marcadores tumorais relacionados ao prognóstico dos pacientes podem auxiliar no tratamento oncológico através de abordagem terapêutica mais agressiva sobre determinados padrões genéticos. Além disso, permitiria ensaios com novas drogas e testes de agentes monoclonais e específicos para o bloqueio adequado dos processos envolvidos na carcinogênese.

REFERÊNCIAS

- 1. Unni KK. Bone tumors. New York: Churchill Livingstone; 1988.**
- 2. Kaya M, Wada T, Akatsuka T, Kawaguchi S, Nagoya S, Shindoh M, et al. Vascular endothelial growth factor expression in untreated osteosarcoma is predictive of pulmonary metastasis and poor prognosis. Clin Cancer Res. 2000 Feb;6(2):572-7.**
- 3. Unni KK. Osteosarcoma. In: Unni KK, editor. Dahlin's Bone Tumors. 6th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2010. p. 122-57.**
- 4. Unni KK, Dahlin DC. Dahlin's bone tumors : general aspects and data on 11,087 cases. 5th ed. Philadelphia: Lippincott-Raven; 1996.**
- 5. Petrilli AS, de Camargo B, Filho VO, Bruniera P, Brunetto AL, Jesus-Garcia R, et al. Results of the Brazilian Osteosarcoma Treatment Group Studies III and IV: prognostic factors and impact on survival. J Clin Oncol. 2006 Mar 1;24(7):1161-8.**
- 6. Kaya M, Wada T, Kawaguchi S, Nagoya S, Yamashita T, Abe Y, et al. Increased pre-therapeutic serum vascular endothelial growth factor in patients with early clinical relapse of osteosarcoma. Br J Cancer. 2002 Mar 18;86(6):864-9.**
- 7. DuBois S, Demetri G. Markers of angiogenesis and clinical features in patients with sarcoma. Cancer. 2007 Mar 1;109(5):813-9.**
- 8. Dvorak HF, Brown LF, Detmar M, Dvorak AM. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor, microvascular hyperpermeability, and angiogenesis. Am J Pathol. 1995 May;146(5):1029-39.**

9. Hoang BH, Dyke JP, Koutcher JA, Huvos AG, Mizobuchi H, Mazza BA, et al. VEGF expression in osteosarcoma correlates with vascular permeability by dynamic MRI. *Clin Orthop Relat Res.* 2004 Sep(426):32-8.
10. Akatsuka T, Wada T, Kokai Y, Kawaguchi S, Isu K, Yamashiro K, et al. ErbB2 expression is correlated with increased survival of patients with osteosarcoma. *Cancer.* 2002 Mar 1;94(5):1397-404.
11. Akatsuka T, Wada T, Kokai Y, Sawada N, Yamawaki S, Ishii S. Loss of ErbB2 expression in pulmonary metastatic lesions in osteosarcoma. *Oncology.* 2001;60(4):361-6.
12. Gorlick R, Huvos AG, Heller G, Aledo A, Beardsley GP, Healey JH, et al. Expression of HER2/erbB-2 correlates with survival in osteosarcoma. *J Clin Oncol.* 1999 Sep;17(9):2781-8.
13. Lee YH, Tokunaga T, Oshika Y, Suto R, Yanagisawa K, Tomisawa M, et al. Cell-retained isoforms of vascular endothelial growth factor (VEGF) are correlated with poor prognosis in osteosarcoma. *Eur J Cancer.* 1999 Jul;35(7):1089-93.
14. Brown LF, Berse B, Jackman RW, Tognazzi K, Manseau EJ, Senger DR, et al. Expression of vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) and its receptors in adenocarcinomas of the gastrointestinal tract. *Cancer Res.* 1993 Oct 1;53(19):4727-35.
15. Ishigami SI, Arie S, Furutani M, Niwano M, Harada T, Mizumoto M, et al. Predictive value of vascular endothelial growth factor (VEGF) in metastasis and prognosis of human colorectal cancer. *Br J Cancer.* 1998 Nov;78(10):1379-84.

16. Inoue K, Ozeki Y, Suganuma T, Sugiura Y, Tanaka S. Vascular endothelial growth factor expression in primary esophageal squamous cell carcinoma. Association with angiogenesis and tumor progression. *Cancer*. 1997 Jan 15;79(2):206-13.
17. Gschwind A, Fischer OM, Ullrich A. The discovery of receptor tyrosine kinases: targets for cancer therapy. *Nat Rev Cancer*. 2004 May;4(5):361-70.
18. Onda M, Matsuda S, Higaki S, Iijima T, Fukushima J, Yokokura A, et al. ErbB-2 expression is correlated with poor prognosis for patients with osteosarcoma. *Cancer*. 1996 Jan 1;77(1):71-8.
19. Folkman J. What is the evidence that tumors are angiogenesis dependent? *J Natl Cancer Inst*. 1990 Jan 3;82(1):4-6.
20. Folkman J. Endothelial cells and angiogenic growth factors in cancer growth and metastasis. Introduction. *Cancer Metastasis Rev*. 1990 Nov;9(3):171-4.
21. Maia DM. Immunohistochemical assays for HER2 overexpression. *J Clin Oncol*. 1999 May;17(5):1650.
22. Muss HB, Thor AD, Berry DA, Kute T, Liu ET, Koerner F, et al. c-erbB-2 expression and response to adjuvant therapy in women with node-positive early breast cancer. *N Engl J Med*. 1994 May 5;330(18):1260-6.
23. Slamon DJ, Clark GM, Wong SG, Levin WJ, Ullrich A, McGuire WL. Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science*. 1987/01/09 ed; 1987. p. 177-82.
24. Willmore-Payne C, Holden JA, Zhou H, Gupta D, Hirschowitz S, Wittwer CT, et al. Evaluation of Her-2/neu gene status in osteosarcoma by

fluorescence in situ hybridization and multiplex and monoplex polymerase chain reactions. Arch Pathol Lab Med. 2006 May;130(5):691-8.

25. Maitra A, Wanzer D, Weinberg AG, Ashfaq R. Amplification of the HER-2/neu oncogene is uncommon in pediatric osteosarcomas. Cancer. 2001 Aug 1;92(3):677-83.

26. Qu JT, Wang M, He HL, Tang Y, Ye XJ. The prognostic value of elevated vascular endothelial growth factor in patients with osteosarcoma: a meta-analysis and systemic review. J Cancer Res Clin Oncol. May;138(5):819-25.

27. Kilpatrick SE, Geisinger KR, King TS, Sciarrotta J, Ward WG, Gold SH, et al. Clinicopathologic analysis of HER-2/neu immunoexpression among various histologic subtypes and grades of osteosarcoma. Mod Pathol. 2001 Dec;14(12):1277-83.

28. Li YG, Geng X. A meta-analysis on the association of HER-2 overexpression with prognosis in human osteosarcoma. Eur J Cancer Care (Engl). May;19(3):313-6.

HIPÓTESES E OBJETIVOS

Hipótese Nula

Pacientes com osteossarcoma não apresentam superexpressão imuno-histoquímica das proteínas VEGF e HER2.

Hipótese Operacional

Pacientes com osteossarcoma apresentam superexpressão imuno-histoquímica das proteínas VEGF e HER-2.

OBJETIVOS

Objetivo Geral

Determinar a prevalência da superexpressão imuno-histoquímica de VEGF e HER2 em pacientes portadores de osteossarcoma.

Objetivos Secundários

Relacionar a expressão de VEGF e HER-2 com o prognóstico.

ARTIGO (EM PORTUGUÊS)

EXPRESSÃO IMUNO-HISTOQUÍMICA DAS PROTEÍNAS VEGF E HER-2 EM BIÓPSIAS DE OSTEOSSARCOMA

Running Head: VEGF e HER-2 em osteossarcoma

Carlos Roberto Galia Ph.D

Ricardo Gehrke Becker M.D.

Sandra Morini Ph.D

Cristiano Ribeiro Viana M.D.

Artigo: 2 tabelas, 3 figuras, 2.182 palavras e 28 referências

Pedidos de impressão e correspondência para:

**Ricardo G. Becker, MD
Serviço de Ortopedia e Traumatologia
Hospital de Clínicas de Porto Alegre - UFRGS
Rua Ramiro Barcelos 2350, Térreo - Zona 10 (Sala de Gesso).
CEP 91.035.095 Porto Alegre, RS, Brasil
E-mail: *ricardogbecker@hotmail.com***

Porto Alegre, Agosto de 2012

RESUMO

Introdução: Osteossarcoma é um tipo de câncer ósseo agressivo encontrado geralmente em jovens. VEGF e HER-2 têm sido utilizados em diversos tipos de tumores como possíveis marcadores de imuno-histoquímica relacionados ao prognóstico; no entanto, estudos realizados em osteossarcomas ainda apresentam resultados contraditórios.

Objetivos: Identificar a prevalência de HER-2 e do fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF) em biópsias de osteossarcoma e correlacioná-los com possíveis fatores de prognóstico.

Métodos: Estudo retrospectivo realizado no Hospital de Câncer de Barretos-SP incluindo 27 biópsias de osteossarcoma imuno-histoquimicamente coradas para VEGF e HER-2. Características clínico-patológicas foram coletadas dos prontuários médicos dos pacientes para correlação com marcadores.

Resultados: Em 27 biópsias, quatro foram superexpressas para VEGF e três para HER-2. Dois terços dos pacientes eram não metastáticos. Quase todos pacientes com VEGF superexpresso apresentaram metástases. A superexpressão para HER-2 apresentou relação inversa à presença de metástases. Não houve associação significativa entre os marcadores e o prognóstico.

Conclusão: Identificamos baixa prevalência de VEGF e HER-2 na amostra. Não houve associação significativa entre superexpressão dos marcadores e características clínico-patológicas. A ampliação da amostra e do tempo de seguimento, além do emprego de novas técnicas laboratoriais pode determinar a real expressão de VEGF e HER-2 e seu papel em osteossarcomas.

Palavras-chave: VEGF; HER2; Osteossarcoma; Prognóstico; Imuno-histoquímica;

INTRODUÇÃO

Osteossarcoma é um tipo de câncer ósseo agressivo de origem mesenquimal geralmente encontrado em jovens entre 10 e 25 anos. Qualquer osso do corpo humano pode ser acometido por esta neoplasia e a sobrevida geral em 5 anos é de aproximadamente 65 a 75%. A principal causa de óbito são as metástases pulmonares, diagnosticadas por Tomografia Computadorizada (TC) em 35 a 45% dos pacientes portadores de osteossarcoma (1, 2). Diversos protocolos foram desenvolvidos nas últimas décadas incluindo quimioterapia em altas doses e novas técnicas para ressecções com margem oncológica e reconstruções preservadoras de extremidades. Apesar da evolução no campo da oncologia, a busca por melhores resultados em curvas de sobrevida ainda continua sendo um desafio, principalmente em pacientes portadores de metástases (3-7).

O crescimento tumoral depende da proliferação de novos vasos sanguíneos em seu interior, os quais estão diretamente e indiretamente relacionados à liberação de diversos fatores de crescimento tanto pelo tumor primário quanto pelas lesões metastáticas decorrentes. A identificação de marcadores tumorais tem sido motivo de pesquisas com o objetivo de identificar e estratificar pacientes com alto ou baixo risco para desenvolvimento de metástases. A superexpressão do Fator de Crescimento do Endotélio Vascular (VEGF) e do Receptor tipo 2 do Fator de Crescimento Epidérmico Humano (HER-2) tem evidenciado resultados conflitantes com relação ao prognóstico em portadores de osteossarcoma (5, 6, 8-15).

VEGF é uma proteína homodimérica que aumenta a permeabilidade endotelial vascular e estimula a proliferação de células endoteliais. Esta proteína está diretamente envolvida no processo de angiogênese, que é responsável pela neovascularização, crescimento tumoral e surgimento de metástases. A neovascularização é evidente em amostras histológicas de osteossarcomas clássicos, o que reflete a agressividade e o potencial metastático deste tipo de câncer (5, 11, 13-15). Em tumores do aparelho gastrointestinal como o carcinoma gástrico (16), os tumores esofágicos (17) e os carcinomas colorretais (18), a superexpressão de VEGF sugere relação direta com pior prognóstico. No entanto, evidências clínicas ainda não estão bem estabelecidas entre a expressão deste marcador de angiogênese e sobrevida em portadores de osteossarcoma (3, 5, 6).

O oncogene HER-2 (ErbB-2 ou neu) é o responsável pela codificação de uma glicoproteína transmembrana chamada HER-2, que está superexpressa em 20 a 40% dos pacientes portadores de câncer de mama, sendo associada ao pior prognóstico (19). Este marcador biológico também tem sido relacionado à menor sobrevida, má resposta à quimioterapia e à presença de metástases em alguns estudos envolvendo o osteossarcoma (8, 10-12) .

Esta coorte histórica tem o objetivo de identificar a prevalência de VEGF e HER-2 em biópsias de osteossarcoma anteriores à quimioterapia e correlacionar a superexpressão destes marcadores a características clínico-patológicas envolvidas com o prognóstico.

PACIENTES E MÉTODOS

Pacientes e amostras histológicas

Neste estudo realizado entre 2005 e 2009, 27 pacientes com osteossarcoma tiveram seus prontuários médicos revisados e suas biópsias coradas para VEGF e HER-2. Todas as amostras foram fixadas em formalina 10%, incluídas em blocos de parafina e armazenadas no departamento de patologia do Hospital de Câncer de Barretos - Brasil. Os critérios para inclusão foram pacientes de ambos os sexos, com idade entre 5 e 30 anos, diagnóstico de osteossarcoma sem tratamento prévio, além de presença ou ausência de metástases. A violação no protocolo de tratamento foi considerada critério de exclusão do estudo. Características clínico-patológicas como idade, sexo, subtipo histológico, término do protocolo, resposta à quimioterapia neoadjuvante e a presença de metástases foram analisados e tabulados. Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da instituição (CEP #195/2009).

Técnica de imuno-histoquímica

Todas as amostras foram incluídas em blocos de parafina e submetidas a cortes de 2 a 3 micra em micrótomo padronizado e coradas imuno-histoquimicamente pelo método do complexo avidina-biotina-peroxidase. O anticorpo primário para VEGF foi um anticorpo anti-humano monoclonal de ratos em diluição de 1:50 (DakoCytomation, Denmark, A/S), e para HER-2, o anticorpo anti-humano policlonal de coelhos em diluição de 1:200 (DakoCytomation, Denmark, A/S). A recuperação antigênica foi realizada através da incubação em calor úmido em tampão de citrato (Dako – 10 mM, pH 9,0 e 90°C). A amplificação da reação foi realizada no Dakoautostainer (Universal Staining System – Dako). Os controles positivos e negativos foram utilizados para cada teste.

Avaliação imuno-histoquímica

Dois patologistas (SM e CRV) analisaram as amostras de osteossarcomas sem qualquer informação sobre o histórico dos pacientes e utilizaram um microscópio de duas cabeças binoculares simultaneamente. VEGF foi considerado positivo quando corados mais de 30% tanto do citoplasma quanto da membrana das células tumorais (5). HER-2 foi avaliado através de escala semi-quantitativa. As amostras foram graduadas de 0 (zero) até +3 de acordo com a proporção de células coradas tanto no citoplasma quanto na membrana. Resultados de zero a +1 foram considerados como até 30% das células coradas e, de +2 até +3, como acima de 30%. Apenas a coloração de imuno-histoquímica acima de 30% foi classificada como superexpressão de HER-2 (10, 20). Frequências quase similares de porcentagem de células coradas foram encontradas pelos patologistas com índice *kappa* menor que 5% (21).

Análise estatística

Todas as variáveis foram descritas por frequências absolutas e relativas, exceto a idade que foi descrita por média e desvio padrão. Para comparar os grupos foi aplicado o teste t-student (idade) e o teste exato de Fisher (demais variáveis). Para estimar as curvas de sobrevida, o método de Kaplan-Meier foi aplicado e para compará-las foi utilizado o teste log-rank. O nível de significância adotado foi de 5% ($p \leq 0,05$) e as análises foram realizadas no programa SPSS (*Statistical Package for the Social Sciences*) versão 18.0.

RESULTADOS

Os resultados deste estudo estão sumarizados nas tabelas 1 e 2.

Quinze pacientes eram do sexo masculino e 12 do sexo feminino, com média de idade de 13 anos (sete a 27 anos). Os casos foram divididos em acima (n=21) e abaixo (n=6) de 14 anos considerando como um maior ou menor risco de agressividade do tumor. Treze indivíduos concluíram o protocolo brasileiro (GBTO) e nove permaneciam em tratamento durante este estudo (4). Todos osteossarcomas foram estadiados em IIB e III de acordo com o *Sistema de Estadiamento de Enneking* (22). Oito pacientes (30%) apresentaram metástases pulmonares no momento do diagnóstico e foram classificados como estágio III. Nenhum paciente apresentou descrição de metástases não pulmonares em nossa casuística.

Os subtipos histológicos foram descritos de acordo com a *OMS - Classificação de Tumores Ósseos, 2002* (23). A classificação de *Huvos-Ayala* foi utilizada para descrever a resposta à quimioterapia neoadjuvante como pobre (I-II) e boa (III-IV) (24). Mais da metade dos pacientes (56%) apresentaram pobre resposta ao tratamento quimioterápico neoadjuvante, enquanto apenas 22% apresentaram boa resposta. A tabela 1 descreve todas variáveis clínico-patológicas analisadas. O intervalo de seguimento foi registrado desde a biópsia inicial até julho de 2009. O período mínimo de seguimento foi de seis meses.

Apenas quatro amostras (15%) apresentaram superexpressão de VEGF. Todas amostras positivas para VEGF foram encontradas no sexo masculino, e acima de 14 anos. Três quartos (75%) dos pacientes que superexpressaram VEGF apresentaram metástases pulmonares, inferindo um risco teórico para pior prognóstico já descrito em publicações prévias (5, 9). A tabela 1 sumariza a correlação entre VEGF e as variáveis analisadas. Não encontramos correlação significativa quando realizadas análises descritiva e univariada. Curvas de sobrevida de Kaplan-Meier para VEGF estão descritas na Figura 1. Imuno-histoquímica de VEGF é demonstrada na figura 3 (A).

A superexpressão de HER-2 foi observada em três casos (11%). Todos do sexo masculino, e dois (67%), acima de 14 anos. Metástases pulmonares foram identificadas em apenas um terço dos pacientes com HER-2 considerados positivos (>1+). As amostras coradas como positivas para HER-2 não apresentavam descrição sobre resposta à quimioterapia em

nossos arquivos médicos. Não encontramos correlação significativa quando realizadas análises descritiva e univariada. Curvas de sobrevida de Kaplan-Meier para HER-2 estão descritas na Figura 2. Imuno-histoquímica de HER-2 é demonstrada na figura 3 (B).

DISCUSSÃO

No presente estudo, demonstrou-se a baixa prevalência de VEGF (15%) e HER-2 (11%) em biópsias de osteossarcoma analisadas através de imuno-histoquímica. Diferentes métodos para quantificar a presença de marcadores biológicos teoricamente envolvidos na proliferação e disseminação de tumores têm sido descritos nas últimas décadas. Testes laboratoriais como a imuno-histoquímica, pesquisa de DNA e de RNA estão entre os mais conhecidos. Diferenças entre protocolos de pesquisa incluindo uma grande variedade de anticorpos e de técnicas sem padronização para a identificação de genes são responsáveis pela discrepância em estudos ao redor do mundo (23, 25).

Desde que o DNA complementar do HER-2 foi isolado há aproximadamente 25 anos, vieram à tona importantes descobertas no mecanismo de ação dos receptores de tirosinoquinases (RTQ), que quando mutados ou alterados, tornam-se potentes oncoproteínas. Em 1985, o grupo de Ullrich da Genentech descreveu a estrutura primária completa de suposto RTQ que demonstrou alto grau de homologia com o Receptor do Fator de Crescimento Epidérmico (EGFR) humano, tendo sido denominado de *human EGFR-related 2*, ou HER2 (25). Dois anos mais tarde, Slamon *et al.* relataram que o HER2 encontrava-se amplificado em 30% dos casos de câncer de mama invasivos e, pela primeira vez, demonstraram correlação significativa entre a superexpressão de HER2, redução da sobrevida e recidiva tumoral aumentada (19).

No final dos anos 90, dois estudos sugeriram que a superexpressão de HER-2 em osteossarcoma poderia estar associada à menor sobrevida e ao desenvolvimento de metástases. Em um destes estudos, 26 amostras de osteossarcomas foram analisadas para HER-2 através de imuno-histoquímica, e a superexpressão de HER-2 foi identificada em 42% das amostras. No entanto, os pacientes metastáticos foram incluídos na mesma amostra e os protocolos de quimioterapia não foram adequadamente descritos. Por fim, pacientes em estágios IIB e III deveriam ter sido analisados separadamente para HER-2, pois é de conhecimento geral que o prognóstico de indivíduos metastáticos (III) é inferior ao dos não metastáticos (IIB) (8). No outro estudo, 53 amostras de osteossarcomas foram analisadas, enquanto todos pacientes portadores de metástases (estágio III) foram excluídos. Nem dados a

respeito da sobrevida geral, nem qualquer descrição sobre análises uni ou multivariadas foram descritos (12).

Em 2002, Akatsuka *et al.* propuseram diferente explicação para a associação entre a superexpressão de HER-2 e os achados clínicos em osteossarcoma, comparando os níveis de HER-2 entre amostras de biópsias, de tumores ressecados após a quimioterapia neoadjuvante e de metástases pulmonares em 19 pacientes não metastáticos ao diagnóstico. O desaparecimento de HER-2 foi visível durante o tratamento com quimioterapia em 14 de 19 pacientes (74%) a medida que se tornaram metastáticos. Estes achados sugerem que a superexpressão de HER-2 não tem um papel importante no desenvolvimento de metástases, e que tumores onde o HER-2 é superexpresso existirá maior benefício com a quimioterapia em relação à sobrevida geral e livre de doença quando comparados aos com HER-2 negativo (10).

A expressão de VEGF tem sido utilizada como um marcador mais objetivo para avaliar a importância da angiogênese em tumores sólidos como o osteossarcoma. Um estudo com 30 pacientes identificou que o mRNA de VEGF estava expresso em todas as amostras tumorais, e em 80% na isoforma de VEGF165. Apenas 20% expressava a isoforma VEGF121. 83% dos VEGF165-positivos desenvolveram metástases, enquanto o mesmo ocorreu em apenas 16% dos VEGF165-negativos. Nos mesmos grupos, VEGFR-1 e 2 (receptores tipo 1 e 2 de VEGF) foram expressos em mais da metade dos pacientes, porém a expressão não se correlacionou com o prognóstico. Os indivíduos deste estudo não haviam sido submetidos a tratamento prévio e também não apresentavam metástases ao diagnóstico, e o VEGF foi analisado através da reação em cadeia de polimerase transcriptase (RT-PCR) (9, 26).

Em outro estudo, 63% de 27 pacientes expressaram VEGF através de imunohistoquímica. Oitenta e dois por cento das amostras onde o VEGF foi positivo desenvolveram metástases, enquanto apenas 10% nas amostras onde VEGF foi negativo. Como esperado, a sobrevida nos indivíduos com VEGF positivo foi menor que a dos negativos (5). Um grupo de pesquisas norte-americano descreveu em 2004 a possível relação entre a expressão de VEGF em biópsias de osteossarcoma e o nível de permeabilidade vascular através de Ressonância Nuclear Magnética (RNM) em 15 pacientes. Dez amostras coraram-se positivas à imunohistoquímica, sendo quatro com 1+, outras quatro com 2+, e mais duas com 3+. Qualquer positividade tanto em citoplasma quanto em membrana foi considerada. O único achado

significativo entre VEGF superexpresso e alto coeficiente de permeabilidade foi possível quando as amostras foram estratificadas, ou seja, avaliadas separadamente (0, 1+, 2+, 3+) de acordo com o número de cruces (27).

Uma metanálise incluindo 387 pacientes em 11 publicações identificou taxa de risco de 2,84 para VEGF positivos em relação ao risco de óbito quando comparados aos VEGF negativos. Estes achados, apesar da heterogeneidade das publicações incluídas, sugerem pior prognóstico para biópsias onde VEGF apresentou-se superexpresso (28).

A superexpressão das proteínas de VEGF e HER-2 demonstrou baixa prevalência, sendo de apenas 11% e 15%, respectivamente. Não foi encontrada correlação significativa entre a superexpressão de HER-2 e VEGF quanto à sobrevida geral e livre de doença. As variáveis clínicas como idade, gênero, resposta à quimioterapia, subtipo histológico, desenvolvimento de metástases também não apresentaram associação significativa com HER2 e VEGF. O tamanho da amostra e o período de seguimento deste estudo necessitam ser ampliados para fornecer mais informações a respeito da relevância destes marcadores.

REFERÊNCIAS

1. Unni KK. Bone tumors. New York: Churchill Livingstone; 1988.
2. Unni KK. Osteosarcoma. In: Unni KK, editor. Dahlin's Bone Tumors. 6th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2010. p. 122-57.
3. Kaya M, Wada T, Kawaguchi S, Nagoya S, Yamashita T, Abe Y, et al. Increased pre-therapeutic serum vascular endothelial growth factor in patients with early clinical relapse of osteosarcoma. *Br J Cancer*. 2002 Mar 18;86(6):864-9.
4. Petrilli AS, de Camargo B, Filho VO, Bruniera P, Brunetto AL, Jesus-Garcia R, et al. Results of the Brazilian Osteosarcoma Treatment Group Studies III and IV: prognostic factors and impact on survival. *J Clin Oncol*. 2006 Mar 1;24(7):1161-8.
5. Kaya M, Wada T, Akatsuka T, Kawaguchi S, Nagoya S, Shindoh M, et al. Vascular endothelial growth factor expression in untreated osteosarcoma is predictive of pulmonary metastasis and poor prognosis. *Clin Cancer Res*. 2000 Feb;6(2):572-7.
6. DuBois S, Demetri G. Markers of angiogenesis and clinical features in patients with sarcoma. *Cancer*. 2007 Mar 1;109(5):813-9.
7. Folkman J. What is the evidence that tumors are angiogenesis dependent? *J Natl Cancer Inst*. 1990 Jan 3;82(1):4-6.
8. Onda M, Matsuda S, Higaki S, Iijima T, Fukushima J, Yokokura A, et al. ErbB-2 expression is correlated with poor prognosis for patients with osteosarcoma. *Cancer*. 1996 Jan 1;77(1):71-8.
9. Lee YH, Tokunaga T, Oshika Y, Suto R, Yanagisawa K, Tomisawa M, et al. Cell-retained isoforms of vascular endothelial growth factor (VEGF) are correlated with poor prognosis in osteosarcoma. *Eur J Cancer*. 1999 Jul;35(7):1089-93.
10. Akatsuka T, Wada T, Kokai Y, Kawaguchi S, Isu K, Yamashiro K, et al. ErbB2 expression is correlated with increased survival of patients with osteosarcoma. *Cancer*. 2002 Mar 1;94(5):1397-404.
11. Akatsuka T, Wada T, Kokai Y, Sawada N, Yamawaki S, Ishii S. Loss of ErbB2 expression in pulmonary metastatic lesions in osteosarcoma. *Oncology*. 2001;60(4):361-6.

12. Gorlick R, Huvos AG, Heller G, Aledo A, Beardsley GP, Healey JH, et al. Expression of HER2/erbB-2 correlates with survival in osteosarcoma. *J Clin Oncol.* 1999 Sep;17(9):2781-8.
13. Banks RE, Forbes MA, Kinsey SE, Stanley A, Ingham E, Walters C, et al. Release of the angiogenic cytokine vascular endothelial growth factor (VEGF) from platelets: significance for VEGF measurements and cancer biology. *Br J Cancer.* 1998 Mar;77(6):956-64.
14. Dvorak HF, Brown LF, Detmar M, Dvorak AM. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor, microvascular hyperpermeability, and angiogenesis. *Am J Pathol.* 1995 May;146(5):1029-39.
15. Folkman J. Endothelial cells and angiogenic growth factors in cancer growth and metastasis. Introduction. *Cancer Metastasis Rev.* 1990 Nov;9(3):171-4.
16. Brown LF, Berse B, Jackman RW, Tognazzi K, Manseau EJ, Senger DR, et al. Expression of vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) and its receptors in adenocarcinomas of the gastrointestinal tract. *Cancer Res.* 1993 Oct 1;53(19):4727-35.
17. Inoue K, Ozeki Y, Suganuma T, Sugiura Y, Tanaka S. Vascular endothelial growth factor expression in primary esophageal squamous cell carcinoma. Association with angiogenesis and tumor progression. *Cancer.* 1997 Jan 15;79(2):206-13.
18. Ishigami SI, Arii S, Furutani M, Niwano M, Harada T, Mizumoto M, et al. Predictive value of vascular endothelial growth factor (VEGF) in metastasis and prognosis of human colorectal cancer. *Br J Cancer.* 1998 Nov;78(10):1379-84.
19. Slamon DJ, Clark GM, Wong SG, Levin WJ, Ullrich A, McGuire WL. Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science.* 1987/01/09 ed; 1987. p. 177-82.
20. Muss HB, Thor AD, Berry DA, Kute T, Liu ET, Koerner F, et al. c-erbB-2 expression and response to adjuvant therapy in women with node-positive early breast cancer. *N Engl J Med.* 1994 May 5;330(18):1260-6.
21. Sim J, Wright CC. The kappa statistic in reliability studies: use, interpretation, and sample size requirements. *Phys Ther.* 2005 Mar;85(3):257-68.

22. Enneking WF, Spanier SS, Goodman MA. A system for the surgical staging of musculoskeletal sarcoma. *Clin Orthop Relat Res.* 1980 Nov-Dec(153):106-20.
23. Fletcher CDMU, K.K. Pathology and Genetics of Soft Tissue and Bone Tumors. Lyon, editor.; 2002.
24. Huvos AG. Bone tumors : diagnosis, treatment, and prognosis. 2nd ed. Philadelphia: W.B. Saunders Co.; 1991.
25. Coussens L, Yang-Feng TL, Liao YC, Chen E, Gray A, McGrath J, et al. Tyrosine kinase receptor with extensive homology to EGF receptor shares chromosomal location with neu oncogene. *Science.* 1985 Dec 6;230(4730):1132-9.
26. McMahon G. VEGF receptor signaling in tumor angiogenesis. *Oncologist.* 2000;5 Suppl 1:3-10.
27. Hoang BH, Dyke JP, Koutcher JA, Huvos AG, Mizobuchi H, Mazza BA, et al. VEGF expression in osteosarcoma correlates with vascular permeability by dynamic MRI. *Clin Orthop Relat Res.* 2004 Sep(426):32-8.
28. Qu JT, Wang M, He HL, Tang Y, Ye XJ. The prognostic value of elevated vascular endothelial growth factor in patients with osteosarcoma: a meta-analysis and systemic review. *J Cancer Res Clin Oncol.* May;138(5):819-25.

TABELA 1 – Significância das variáveis comparadas à expressão de VEGF

Variáveis	Amostra total (n=27)	VEGF negativo (n=23)	VEGF positivo (n=4)	Valor-p
	n (%)	n (%)	n (%)	
Faixa etária				0,545**
≤ 14	6 (22,2)	6 (26,1)	0 (0,0)	
> 14	21 (77,8)	17 (73,9)	4 (100)	
Sexo				0,106**
Masculino	15 (55,6)	11 (47,8)	4 (100)	
Feminino	12 (44,4)	12 (52,2)	0 (0,0)	
Subtipo histológico				0,554*
Osteoblástico	13 (48,1)	11 (47,8)	2 (50,0)	
Teleangiectásico	4 (14,8)	4 (17,4)	0 (0,0)	
Condroblástico	3 (11,1)	2 (8,7)	1 (25,0)	
Fibroblástico	3 (11,1)	2 (8,7)	1 (25,0)	
Indiferenciado	4 (13,8)	4 (17,4)	0 (0,0)	
Metástase				0,065**
Sim	8 (29,6)	5 (21,7)	3 (75,0)	
Não	19 (70,4)	18 (78,3)	1 (25,0)	
Resposta à QT (Huvos-Ayala)				0,053*
Pobre (I-II)	15 (55,6)	15 (65,2)	0 (0,0)	
Boa (III-IV)	6 (22,2)	4 (17,4)	2 (50,0)	
N.D.	6 (22,2)	4 (17,4)	2 (50,0)	
Protocolo completo				0,531*
Sim	13 (48,1)	11 (47,8)	2 (50,0)	
Não	9 (33,3)	7 (30,4)	2 (50,0)	
N.D.	5 (18,5)	5 (21,7)	0 (0,0)	

Legenda: N.D. = Não determinado; VEGF = Fator de crescimento do endotélio vascular

* teste qui-quadrado de Pearson; ** teste exato de Fisher

TABELA 2 – Significância das variáveis comparadas à expressão de HER-2

Variáveis	Amostra total (n=27)	HER-2 negativo (n=24)	HER-2 positivo (n=3)	Valor-p
	n (%)	n (%)	n (%)	
Faixa etária				0,545**
≤ 14	6 (22,2)	5 (20,8)	1 (33,3)	
> 14	21 (77,8)	19 (79,2)	2 (66,7)	
Sexo				0,231**
Masculino	15 (55,6)	12 (50,0)	3 (100)	
Feminino	12 (44,4)	12 (50,0)	0 (0,0)	
Subtipo histológico				0,686*
Osteoblástico	13 (48,1)	11 (45,8)	2 (66,7)	
Teleangiectásico	4 (14,8)	4 (16,7)	0 (0,0)	
Condroblástico	3 (11,1)	3 (12,5)	0 (0,0)	
Fibroblástico	3 (11,1)	3 (12,5)	0 (0,0)	
Indiferenciado	4 (13,8)	3 (12,5)	1 (33,3)	
Metástase				1,000**
Sim	8 (29,6)	7 (29,2)	1 (33,3)	
Não	19 (70,4)	17 (70,8)	2 (66,7)	
Resposta à QT (Huvos-Ayala)				0,003*
Pobre (I-II)	15 (55,6)	15 (62,5)	0 (0,0)	
Boa (III-IV)	6 (22,2)	6 (25,0)	0 (0,0)	
N.D.	6 (22,2)	3 (12,5)	3 (100)	
Protocolo completo				0,758*
Sim	13 (48,1)	12 (50,0)	1 (33,3)	
Não	9 (33,3)	8 (33,3)	1 (33,3)	
N.D.	5 (18,5)	4 (16,7)	1 (33,3)	

Legenda: N.D. = Não determinado; HER-2 = Fator de crescimento epidermal tipo 2

* teste qui-quadrado de Pearson; ** teste exato de Fisher

LEGENDAS DAS FIGURAS

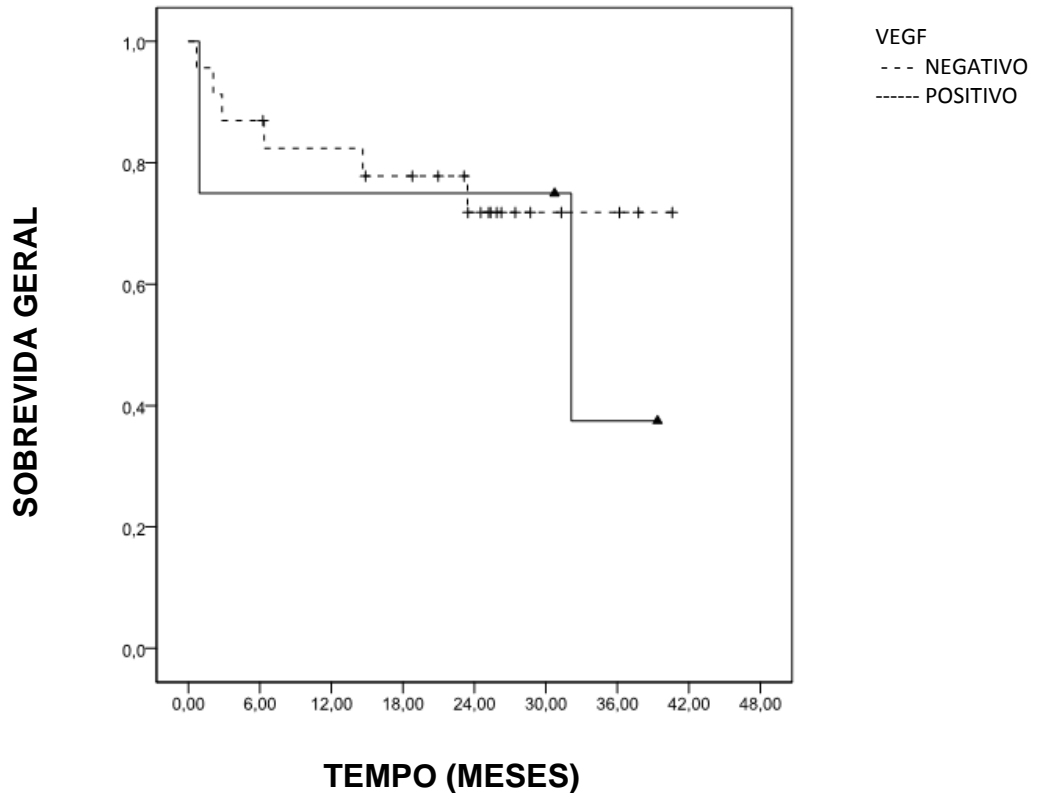
FIGURA 1 – Curva de Kaplan-Meier para (A) sobrevida geral e B) sobrevida livre de doença para casos positivos de VEGF comparados com negativos.

FIGURA 2 – Curva de Kaplan-Meier para (A) sobrevida geral e B) sobrevida livre de doença para casos positivos de HER-2 (ErbB-2) comparados com negativos.

FIGURA 3 – Fotomicrografia de (A) osteossarcoma com positividade citoplasmática de VEGF (400X) e fotomicrografia de (B) osteossarcoma com positividade de membrana de HER-2 (400X).

FIGURA 1

A



B

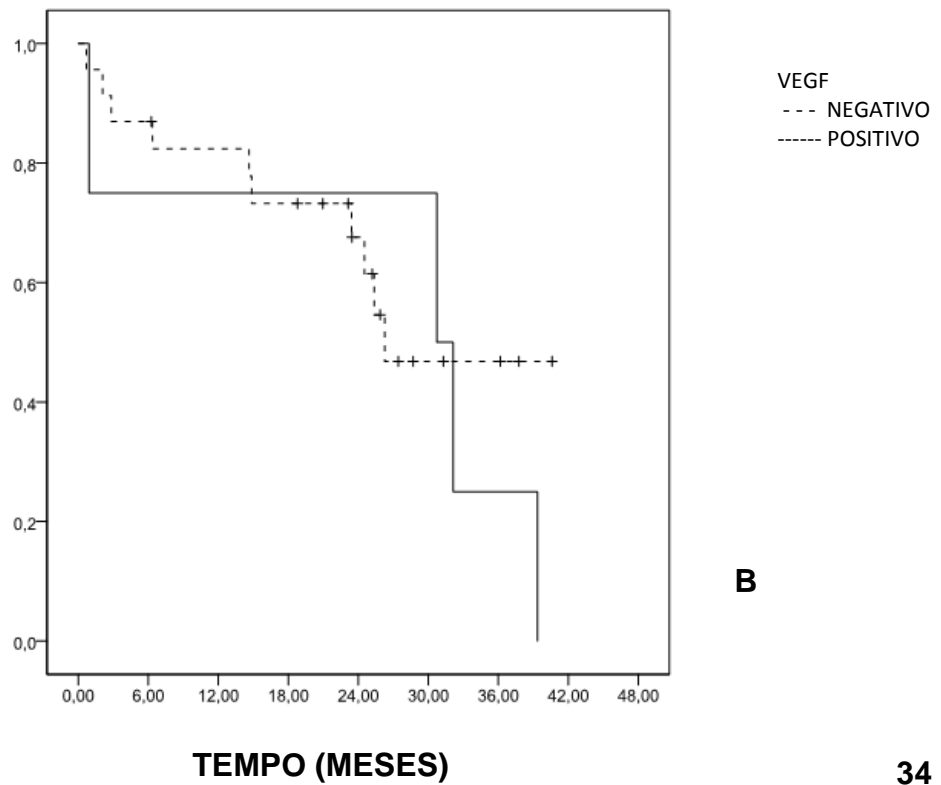
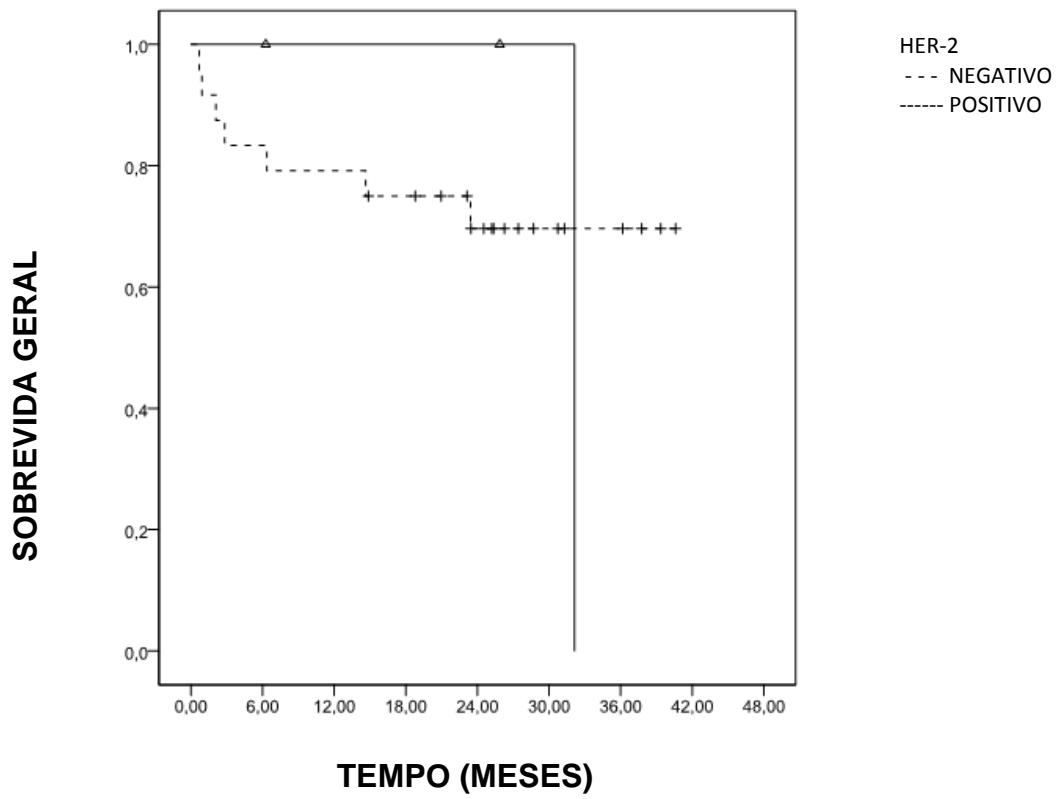
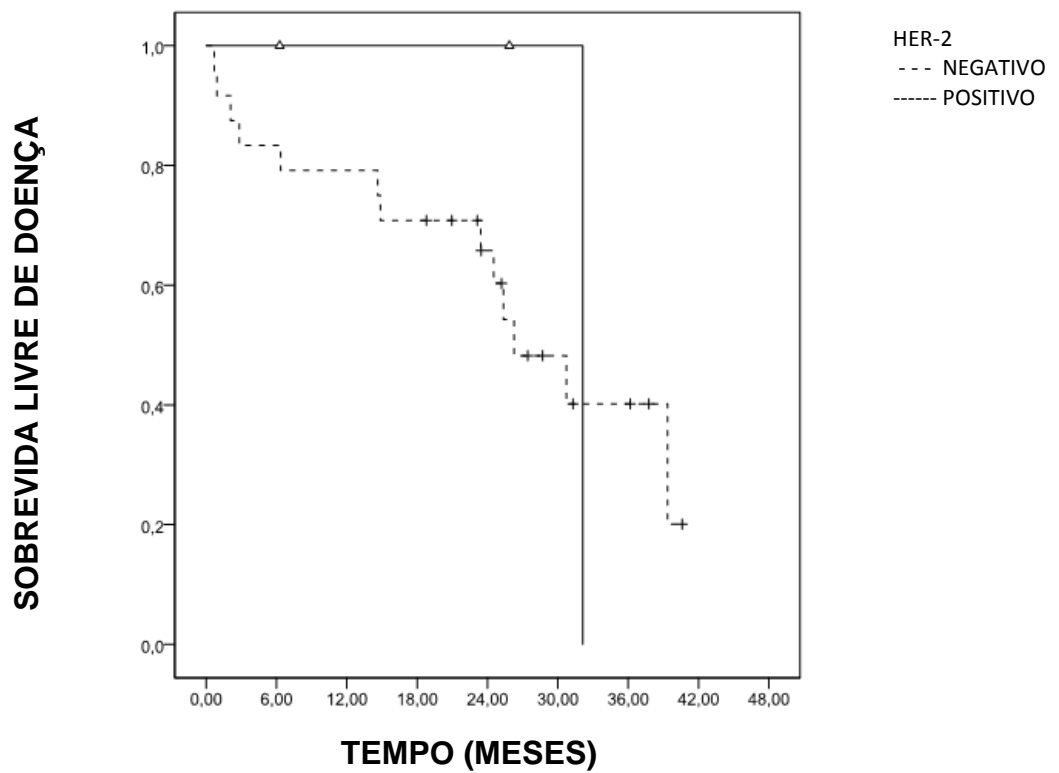


FIGURA 2

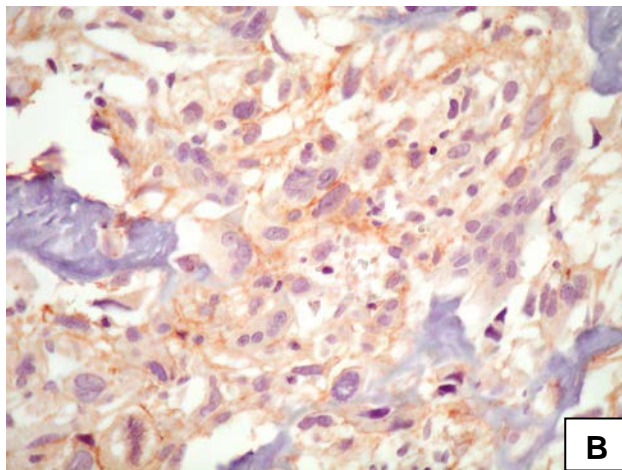
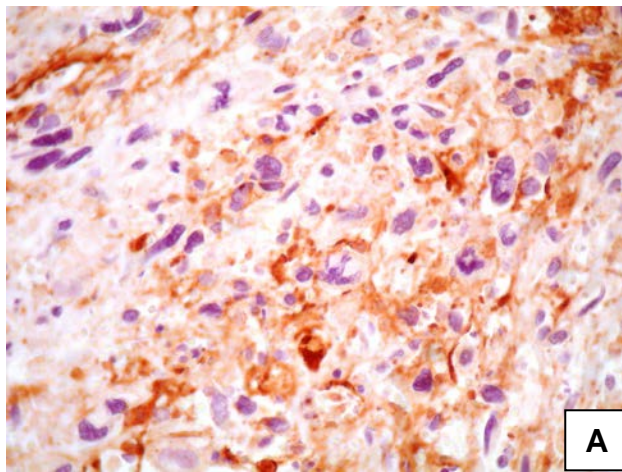


A



B

FIGURA 3



**IMMUNOHISTOCHEMISTRY EXPRESSION OF THE VEGF AND HER-2 PROTEINS IN
OSTEOSARCOMA BIOPSIES**

Running Head: VEGF and HER-2 in osteosarcoma

Carlos Roberto Galia Ph.D.

Ricardo Gehrke Becker M.D.

Sandra Morini Ph.D

Cristiano Ribeiro Viana M.D.

Manuscript: 2 tables, 3 figures, 2.186 words and 28 references

Request off-prints and correspondence to:

**Ricardo G. Becker, MD
Department of Orthopedics and Traumatology
Hospital de Clínicas de Porto Alegre - University Hospital
Rua Ramiro Barcelos 2400, 1st F Zone 10.
91.035.095 Porto Alegre, RS, Brazil
E-mail: rbecker@hcpa.ufrgs.br
or ricardogbecker@hotmail.com**

Porto Alegre, August 2012

ABSTRACT

Introduction: Osteosarcoma is an aggressive bone cancer usually found in young people. Prognosis is related to the chemotherapy response and metastasis. Angiogenesis has been shown to have an important role in tumor growth and metastasis development. Epidermal growth factor receptors have been implicated as possible prognostic markers in a number of different cancers. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and HER-2 markers have been studied in osteosarcoma with contradictory results.

Objectives: To identify the prevalence of HER-2 and vascular endothelial growth factor in osteosarcoma biopsies and to correlate it with prognosis.

Methods: Retrospective study including 27 osteosarcoma biopsies obtained prior to chemotherapy induction were stained for VEGF and HER-2. Clinical features were correlated to immunohistochemical results in an attempt to determine prognostic implications.

Results: Of the 27 osteosarcoma biopsies, four stained positive for VEGF and three for HER-2. Two-thirds were non-metastatic. Almost all the biopsies with positive angiogenic marker were metastatic. An inverse correlation was found between HER-2 expression and metastasis. No significant correlation between tumor markers and prognosis was found.

Conclusion: In our study we found no significant correlation between marker positivity and clinical features, and there was a low prevalence of VEGF and HER-2 in the samples. An increased sample size and expression assessment by means other than immunohistochemistry is needed to determine the true expression of these markers in osteosarcoma.

Keywords: Osteosarcoma; VEGF; HER-2; Prognosis; Immunohistochemistry

INTRODUCTION

Osteosarcoma is an aggressive bone cancer of mesenchymal nature usually found in young people between 10 and 25 years old. Virtually, any bone of the human skeleton can be affected and the 5-year survival rate is approximately 65% to 75%. The main cause of death is pulmonary metastasis, which is diagnosed by CT scans in 35 to 45% of patients with osteosarcoma (1, 2). Many protocols have been developed in the recent decades including high dose multichemotherapy and new techniques for wide tumor resection and reconstruction (3-7). Although attempts have been made to achieve long-term survival disease relapse with lung metastasis is still a major challenge (5).

Tumor growth depends on the proliferation of new vessels, which are directly related to the release of several growth factors at both metastatic and primary sites(3, 7). Identification of biological markers has been investigated in an attempt to stratify high or low risk for metastasis development. The evidence related to the role of Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) and Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 (HER-2) expression in osteosarcoma prognosis is conflicting (3, 6, 8-15).

VEGF is a dimeric protein that increases vascular endothelial permeability and stimulates proliferation of endothelial cells. It is directly involved in the process of angiogenesis, which is the responsible for the development of new vessels, tumor growth and metastatic involvement. Neovascularization is evident with histological analysis of classic osteosarcoma specimens, which demonstrates aggressive features and the potential to metastasize (3, 11, 13-15). In many gastrointestinal tumors such as gastric carcinoma (16), esophageal tumors (17) and colorectal carcinoma (18), high VEGF expression seems to show a close relation with poor prognosis. However, clinical evidence is not well defined concerning this marker and prognosis in osteosarcoma (3, 4, 6).

HER2 (c-ErbB2 or neu) proto-oncogene is responsible for codification of a transmembrane glycoprotein (HER-2) that is expressed in high levels in 20% to 40% of patients with breast cancer (19). This biological marker is related to poor prognosis in breast cancer and has shown decreased survival, presence of metastasis and poor histological response to chemotherapy in osteosarcoma (8, 12). However, some authors have reported that HER-2 did

not relate to poor prognosis in osteosarcoma and that, instead, it seems to be related to a favorable prognosis (10, 11).

This historical cohort aims to identify the prevalence of HER-2 and VEGF in osteosarcoma biopsies before neoadjuvant chemotherapy and to correlate clinical and pathological features that could predict prognosis in cases where these proteins are overexpressed.

PATIENTS AND METHODS

Patients and samples

In this retrospective study, from 2005 through 2009, 27 patients with osteosarcoma before chemotherapy had their medical records reviewed and their biopsy specimens stained for VEGF and HER-2. All biopsies were fixed in formalin 10%, paraffin-embedded and stored in the Department of Pathology of the *Hospital de Câncer de Barretos*- Brazil. Eligible criteria included both gender, age between 5 years and 30 years old, osteosarcoma diagnosis without previous treatment and the presence or absence of metastasis. Treatment protocol violations were considered exclusion criteria. Clinical and pathological features such as age, sex, histological subtype, complete protocol, response to chemotherapy and the presence of pulmonary metastasis were recorded. This study was approved by the Institutional Review Board (IRB # 195/2009).

Immunohistochemical technique

All specimens were paraffin-embedded, sliced into 2-3 micrometer sections and immunohistochemically stained using the avidin-biotin complex method. The primary antibody for VEGF was a monoclonal mouse anti-human at a 1:50 dilution (DakoCytomation, Denmark, A/S) and the antibody for HER-2 was a polyclonal rabbit anti-human at a 1:200 dilution (DakoCytomation, Denmark, A/S). Epitope retrieval was achieved by steaming with a citrate buffer (10 mM, pH 9 and 90°C). The Dakoautostainer (Universal Staining System - Dako) was used as a reaction amplifier. Positive and negative controls were added to each assay.

Immunohistochemical evaluation

Two pathologists (SM and CRV), blinded to patient information, simultaneously analyzed the osteosarcoma specimens using a double-headed microscope. VEGF was considered positive when more than 30% of the cytoplasm or membrane of the tumor cells

were stained (3). HER-2 was evaluated in a semi-quantitative scale. Positive samples were graded from 0 to 3+ according to the proportion of cells stained. 0 to 1+ accounted for 0% to 30% stained cells and were considered negative. 2+ and 3+ accounted for 31% to 100% and were seen as positive (10, 20). Controls were done with breast cancer for HER-2 and colon cancer for VEGF. A similar frequency of stained cells was found in the slides with a discrepancy index less than 5% (21).

Statistical analysis

All variables were described using absolute and relative frequencies, except age that was described using means and standard deviation. Differences between groups were evaluated using the student's *t* test for age and Fisher's exact test for other variables. The Kaplan-Meier method was applied to estimate overall survival and disease-free survival curves and the log-rank test to compare them. SPSS (*Statistical Package for the Social Sciences*) version 18.0 was used for analyzes and statistical significance was defined as $p \leq 0.05$.

RESULTS

The results of this paper are described in tables 1 and 2.

Fifteen patients were males and 12 females with the average age being 13 years old (ranging from 7 to 27). Considering that, theoretically, disease aggressiveness is associated with age, patients were divided into two groups, under (n=6) and over (n=21) 14 years of age. Thirteen patients concluded the Brazilian Protocol (GBTO) and nine were still undergoing treatment during the study (5). All osteosarcoma were in stages IIB or III in Enneking's Staging System (22). Eight patients (30%) had pulmonary metastases at the time of the diagnosis and were staged as Enneking's III. There were no records of bone metastasis in our casuistic.

Histologic subtypes were described according the WHO Classification of Bone Tumors, 2002 (23). Huvos-Ayala classification was used to describe neoadjuvant chemotherapy response as poor (I-II) or good (III-IV)(24). While more than half (56%) had a poor response, only 22% presented as good. The follow-up period was recorded from the time of the biopsy until July 2009. The follow-up was from 6 to 48 months starting from 2005.

The immunohistochemical reaction produced by the VEGF antibody was considered positive in only four cases (15%). All were males and over 14 years old (NS). Three of the four that overexpressed VEGF (75%) were metastatic, inferring the theoretical higher risk described in previous reports (3, 9). Table 1 summarizes correlation between VEGF and clinical variables. No significant correlations were found when descriptive and univariate analyses were applied. The Kaplan-Meier curve is described in Figure 1. Immunohistochemical staining for VEGF is shown in Figure 3 (A).

HER-2 was overexpressed in three cases (11%). All were males and two (67%) were over 14 years old. Pulmonary metastases were noted in only one-third of the patients with HER-2 strongly positive cells (NS). All biopsies that stained positive for HER-2 there were no data records about chemotherapy response in our files. Table 2 summarizes HER-2 and the correlation with clinical variables. No significant correlation was found between the HER-2 samples and clinical outcomes. The Kaplan-Meier curve is described in Figure 2. Immunohistochemical staining for HER-2 is shown in Figure 3 (B).

DISCUSSION

In the present study, we have demonstrated a low prevalence of both VEGF (15%) and HER-2 (11%) in immunohistochemically stained osteosarcoma biopsies. Different methods of quantifying the presence of biological markers theoretically involved in tumor proliferation and dissemination have been reported in recent decades. Immunologic staining, DNA and RNA analyses are among the most used strategies. Unfortunately, different protocols including a variability of antibodies and non-standard techniques for molecular and gene identification are responsible for discrepancies in reports all around the world (23, 25).

Since the cDNA of the epidermal growth factor receptor (EGFR) was isolated nearly 25 years ago, intensive research has led to important discoveries regarding the molecular mechanisms of the tyrosine kinase receptors (TKRs), which, when mutated or altered, become potent oncoprotein. In 1985, the Ullrich group at Genentech described the complete primary structure of a supposed TKR that displayed a high degree of homology with human EGFR, being named human EGFR-related 2, the HER-2 (25). Two years later, Slamon *et al.* reported that HER-2 was found to be amplified in 30% of cases of invasive breast cancer and demonstrated for the first time a significant correlation between HER-2 overexpression, reduced survival and increased recurrence (19).

At the end of 1990's, two studies suggested that, in osteosarcoma, overexpression of HER-2 could be associated with pulmonary metastases and poor prognosis. In one study, 26 osteosarcoma samples were analyzed using immunohistochemistry and overexpression was found in 42% of the samples(8). However, metastatic patients were included in the analyses and the chemotherapy protocols were not well described. Moreover, stage IIB and III should have been considered separately for HER-2 staining, since prognosis for metastatic patients is well known to be poor (8). In the other study, 53 osteosarcoma samples were evaluated while all stage III patients were excluded. Neither overall survival nor data for univariate and multivariate analyses were described (12).

In 2002, Akatsuka *et al.* proposed a different explanation for the association between HER-2 overexpression and clinical outcome for osteosarcoma. They compared levels of HER-2 among biopsy specimens, resected tumors after neoadjuvant chemotherapy and pulmonary metastasis in 19 patients who had no evidence of metastasis. Loss of HER-2 was seen during

high-dose chemotherapy in 14 out of 19 patients as the initial osteosarcoma became metastatic. These results suggest that overexpression of HER-2 does not have an important role in the pulmonary metastasis which is directly related with the prognosis of osteosarcoma. Currently, it is accepted that patients with HER-2 overexpressed in osteosarcoma may benefit from adjuvant chemotherapy in high doses and have longer overall and disease-free survival than those whose tumors do not express HER-2 (10).

VEGF expression has come to be seen as a more objective marker for evaluating the importance of angiogenesis in solid tumors such as osteosarcoma. This marker, also known as vascular permeability factor, is relatively unique among growth factors in terms of its specificity for the vascular endothelium. Its family includes six known members: VEGF, or VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E, and placenta growth factor. VEGF, or VEGF-A, is the most potent direct-acting angiogenic protein of this group. The role of VEGF in angiogenesis is triggered by hypoxemic stimulus in tumor and normal cells. Induction of VEGF gene transcription involves both an enhancement of the VEGF mRNA stability and an increase in the rate of gene transcription. Recent evidence suggests that VEGF may not only play a role in inducing angiogenesis, but also is important in promoting new vessels survival in growing tumors (26).

A meta-analysis including 387 patients in eleven reports has been shown only six positive correlations between VEGF and long-term survival. The Kaplan-Meier curve of these six studies showed a risk ratio of 2.84 (95% CI: 1.39 – 5.83, $p= 0.004$) associated with VEGF-positive conditions in comparison with VEGF-negative conditions. This finding suggests that there was a significant association between VEGF-positive and the 5-year mortality. An univariate analysis of the 11 studies has been shown an small inverse but not significant correlation between VEGF expression and the 5-year survival in osteosarcoma patients (27).

One study with 30 patients found that mRNA was expressed in all tumor samples, and 80% were in a VEGF165 isoform. Only 20% expressed the VEGF121 isoform. Eighty-three percent of the VEGF165-positive patients developed pulmonary metastases compared with only 16% of the VEGF165-negative patients. In the same groups, VEGFR-1 and 2 (Vascular endothelial growth factor receptors 1 and 2) were expressed in more than half the patients, but expression did not correlate with prognosis. VEGF expression was analyzed using reverse

transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) in patients without any previous treatment and metastasis (9).

Another study in 27 patients found that 63% of the tumor samples demonstrated VEGF immunohistochemical staining. VEGF-positive tumors developed metastases in 82% of the cases, against only 10% in VEGF-negative tumors. Not surprisingly, the survival rate in VEGF-positive patients was worse (3). In 2004, a North American group reported a possible correlation between VEGF expression and vascular permeability assessed using dynamic MRI in 15 patients. Ten tumor samples stained positive. Four samples stained 1+, 4 samples stained 2+ and 2 samples stained 3+. Any positivity in the cytoplasm or membrane or both was considered. The degree of VEGF staining was only considered to be significantly correlated with vascular permeability when the tumor samples were stratified in four groups (0 or negative, 1+, 2+, 3+). All other findings had no statistical significance (28).

HER-2 and VEGF have shown a low prevalence in our sample, being stained in only 11% and 15%, respectively. Despite applying appropriate methodologies for immunologic staining and clinical evaluation, no significant correlation was found between either VEGF or HER-2 positivity and either overall or disease-free survival. Clinical variables such as age, sex, chemotherapy response, histologic subtype, metastasis development revealed no significant correlation with VEGF and HER-2. It is our opinion that the sample size should be enlarged and the follow-up interval extended in an attempt to better identify any correlation between clinical features and markers in osteosarcoma.

REFERENCES

1. Unni KK. Bone tumors. New York: Churchill Livingstone; 1988.
2. Unni KK. Osteosarcoma. In: Unni KK, editor. Dahlin's Bone Tumors. 6th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2010. p. 122-57.
3. Kaya M, Wada T, Akatsuka T, Kawaguchi S, Nagoya S, Shindoh M, et al. Vascular endothelial growth factor expression in untreated osteosarcoma is predictive of pulmonary metastasis and poor prognosis. Clin Cancer Res. 2000 Feb;6(2):572-7.
4. Kaya M, Wada T, Kawaguchi S, Nagoya S, Yamashita T, Abe Y, et al. Increased pre-therapeutic serum vascular endothelial growth factor in patients with early clinical relapse of osteosarcoma. Br J Cancer. 2002 Mar 18;86(6):864-9.
5. Petrilli AS, de Camargo B, Filho VO, Bruniera P, Brunetto AL, Jesus-Garcia R, et al. Results of the Brazilian Osteosarcoma Treatment Group Studies III and IV: prognostic factors and impact on survival. J Clin Oncol. 2006 Mar 1;24(7):1161-8.
6. DuBois S, Demetri G. Markers of angiogenesis and clinical features in patients with sarcoma. Cancer. 2007 Mar 1;109(5):813-9.
7. Folkman J. What is the evidence that tumors are angiogenesis dependent? J Natl Cancer Inst. 1990 Jan 3;82(1):4-6.
8. Onda M, Matsuda S, Higaki S, Iijima T, Fukushima J, Yokokura A, et al. ErbB-2 expression is correlated with poor prognosis for patients with osteosarcoma. Cancer. 1996 Jan 1;77(1):71-8.
9. Lee YH, Tokunaga T, Oshika Y, Suto R, Yanagisawa K, Tomisawa M, et al. Cell-retained isoforms of vascular endothelial growth factor (VEGF) are correlated with poor prognosis in osteosarcoma. Eur J Cancer. 1999 Jul;35(7):1089-93.
10. Akatsuka T, Wada T, Kokai Y, Kawaguchi S, Isu K, Yamashiro K, et al. ErbB2 expression is correlated with increased survival of patients with osteosarcoma. Cancer. 2002 Mar 1;94(5):1397-404.
11. Akatsuka T, Wada T, Kokai Y, Sawada N, Yamawaki S, Ishii S. Loss of ErbB2 expression in pulmonary metastatic lesions in osteosarcoma. Oncology. 2001;60(4):361-6.

12. Gorlick R, Huvos AG, Heller G, Aledo A, Beardsley GP, Healey JH, et al. Expression of HER2/erbB-2 correlates with survival in osteosarcoma. *J Clin Oncol.* 1999 Sep;17(9):2781-8.
13. Banks RE, Forbes MA, Kinsey SE, Stanley A, Ingham E, Walters C, et al. Release of the angiogenic cytokine vascular endothelial growth factor (VEGF) from platelets: significance for VEGF measurements and cancer biology. *Br J Cancer.* 1998 Mar;77(6):956-64.
14. Dvorak HF, Brown LF, Detmar M, Dvorak AM. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor, microvascular hyperpermeability, and angiogenesis. *Am J Pathol.* 1995 May;146(5):1029-39.
15. Folkman J. Endothelial cells and angiogenic growth factors in cancer growth and metastasis. Introduction. *Cancer Metastasis Rev.* 1990 Nov;9(3):171-4.
16. Brown LF, Berse B, Jackman RW, Tognazzi K, Manseau EJ, Senger DR, et al. Expression of vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) and its receptors in adenocarcinomas of the gastrointestinal tract. *Cancer Res.* 1993 Oct 1;53(19):4727-35.
17. Inoue K, Ozeki Y, Suganuma T, Sugiura Y, Tanaka S. Vascular endothelial growth factor expression in primary esophageal squamous cell carcinoma. Association with angiogenesis and tumor progression. *Cancer.* 1997 Jan 15;79(2):206-13.
18. Ishigami SI, Aii S, Furutani M, Niwano M, Harada T, Mizumoto M, et al. Predictive value of vascular endothelial growth factor (VEGF) in metastasis and prognosis of human colorectal cancer. *Br J Cancer.* 1998 Nov;78(10):1379-84.
19. Slamon DJ, Clark GM, Wong SG, Levin WJ, Ullrich A, McGuire WL. Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science.* 1987 Jan 9;235(4785):177-82.
20. Muss HB, Thor AD, Berry DA, Kute T, Liu ET, Koerner F, et al. c-erbB-2 expression and response to adjuvant therapy in women with node-positive early breast cancer. *N Engl J Med.* 1994 May 5;330(18):1260-6.
21. Sim J, Wright CC. The kappa statistic in reliability studies: use, interpretation, and sample size requirements. *Phys Ther.* 2005 Mar;85(3):257-68.

22. Enneking WF, Spanier SS, Goodman MA. A system for the surgical staging of musculoskeletal sarcoma. *Clin Orthop Relat Res.* 1980 Nov-Dec(153):106-20.
23. Fletcher CDMU, K.K. Pathology and Genetics of Soft Tissue and Bone Tumors. Lyon, editor.; 2002.
24. Huvos AG. Bone tumors : diagnosis, treatment, and prognosis. 2nd ed. Philadelphia: W.B. Saunders Co.; 1991.
25. Coussens L, Yang-Feng TL, Liao YC, Chen E, Gray A, McGrath J, et al. Tyrosine kinase receptor with extensive homology to EGF receptor shares chromosomal location with neu oncogene. *Science.* 1985 Dec 6;230(4730):1132-9.
26. McMahon G. VEGF receptor signaling in tumor angiogenesis. *Oncologist.* 2000;5 Suppl 1:3-10.
27. Qu JT, Wang M, He HL, Tang Y, Ye XJ. The prognostic value of elevated vascular endothelial growth factor in patients with osteosarcoma: a meta-analysis and systemic review. *J Cancer Res Clin Oncol.* May;138(5):819-25.
28. Hoang BH, Dyke JP, Koutcher JA, Huvos AG, Mizobuchi H, Mazza BA, et al. VEGF expression in osteosarcoma correlates with vascular permeability by dynamic MRI. *Clin Orthop Relat Res.* 2004 Sep(426):32-8.

TABLE 1 – Correlation between VEGF expression and clinicopathological parameters.

Parameters	Total sample (n=27)	VEGF negative (n=23)	VEGF positive (n=4)	<i>p-value</i>
	n (%)	n (%)	n (%)	
Age				0.545**
≤ 14	6 (22.2)	6 (26.1)	0 (0.0)	
> 14	21 (77.8)	17 (73.9)	4 (100)	
Gender				0.106**
Male	15 (55.6)	11 (47.8)	4 (100)	
Female	12 (44.4)	12 (52.2)	0 (0.0)	
Histological subtype				0.554*
Osteoblastic	13 (48.1)	11 (47.8)	2 (50.0)	
Telangiectasic	4 (14.8)	4 (17.4)	0 (0.0)	
Condroblastic	3 (11.1)	2 (8.7)	1 (25.0)	
Fibroblastic	3 (11.1)	2 (8.7)	1 (25.0)	
Undifferentiated	4 (13.8)	4 (17.4)	0 (0.0)	
Metastasis				0.065**
Yes	8 (29.6)	5 (21.7)	3 (75.0)	
No	19 (70.4)	18 (78.3)	1 (25.0)	
Chemotherapy response				0.053*
Poor (I-II)	15 (55.6)	15 (65.2)	0 (0.0)	
Good (III-IV)	6 (22.2)	4 (17.4)	2 (50.0)	
N.A.	6 (22.2)	4 (17.4)	2 (50.0)	
Complete protocol (GBTO)				0.531*
Yes	13 (48.1)	11 (47.8)	2 (50.0)	
No	9 (33.3)	7 (30.4)	2 (50.0)	
N.A.	5 (18.5)	5 (21.7)	0 (0.0)	

N.A. =not available ; VEGF = Vascular Endothelial Growth Factor

* Chi-square Pearson test; ** Fisher exact test

TABLE 2 – Correlation between HER-2 expression and clinicopathological parameters

Parameters	Total sample (n=27)	HER-2 negative (n=24)	HER-2 positive (n=3)	<i>p-value</i>
	n (%)	n (%)	n (%)	
Age				0.545**
≤ 14	6 (22.2)	5 (20.8)	1 (33.3)	
> 14	21 (77.8)	19 (79.2)	2 (66.7)	
Gender				0.231**
Male	15 (55.6)	12 (50.0)	3 (100)	
Female	12 (44.4)	12 (50.0)	0 (0.0)	
Histological subtype				0.686*
Osteoblastic	13 (48.1)	11 (45.8)	2 (66.7)	
Telangiectasic	4 (14.8)	4 (16.7)	0 (0.0)	
Chondroblastic	3 (11.1)	3 (12.5)	0 (0.0)	
Fibroblastic	3 (11.1)	3 (12.5)	0 (0.0)	
Undifferentiated	4 (13.8)	3 (12.5)	1 (33.3)	
Metastasis				1.000**
Yes	8 (29.6)	7 (29.2)	1 (33.3)	
No	19 (70.4)	17 (70.8)	2 (66.7)	
Chemotherapy response				0.003*
Poor (I-II)	15 (55.6)	15 (62.5)	0 (0.0)	
Good (III-IV)	6 (22.2)	6 (25.0)	0 (0.0)	
N.A.	6 (22.2)	3 (12.5)	3 (100)	
Complete protocol (GBTO)				0.758*
Yes	13 (48.1)	12 (50.0)	1 (33.3)	
No	9 (33.3)	8 (33.3)	1 (33.3)	
N.A.	5 (18.5)	4 (16.7)	1 (33.3)	

N.A. =not available; HER-2 = Epidermal Growth Factor Receptor 2

* Chi-square Pearson test; ** Fisher exact test

FIGURE LEGENDS

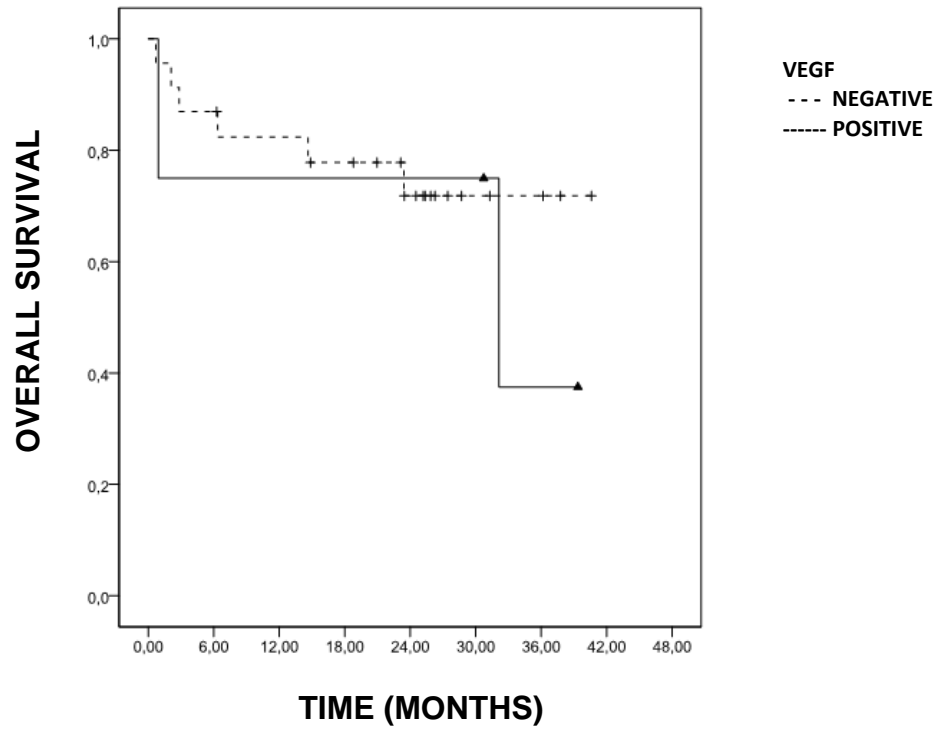
Figure 1 – Kaplan-Meier curves for (A) overall and (B) disease-free survival in VEGF-positive and VEGF-negative.

Figure 2 – Kaplan-Meier curves for (A) overall and (B) disease-free survival in HER-2-positive and HER-2-negative (ErbB-2).

Figure 3 – Representative samples with immunohistochemical staining for (A) VEGF-positive in the cytoplasm and (B) HER-2 positive in the membrane (400X).

FIGURE 1

A



B

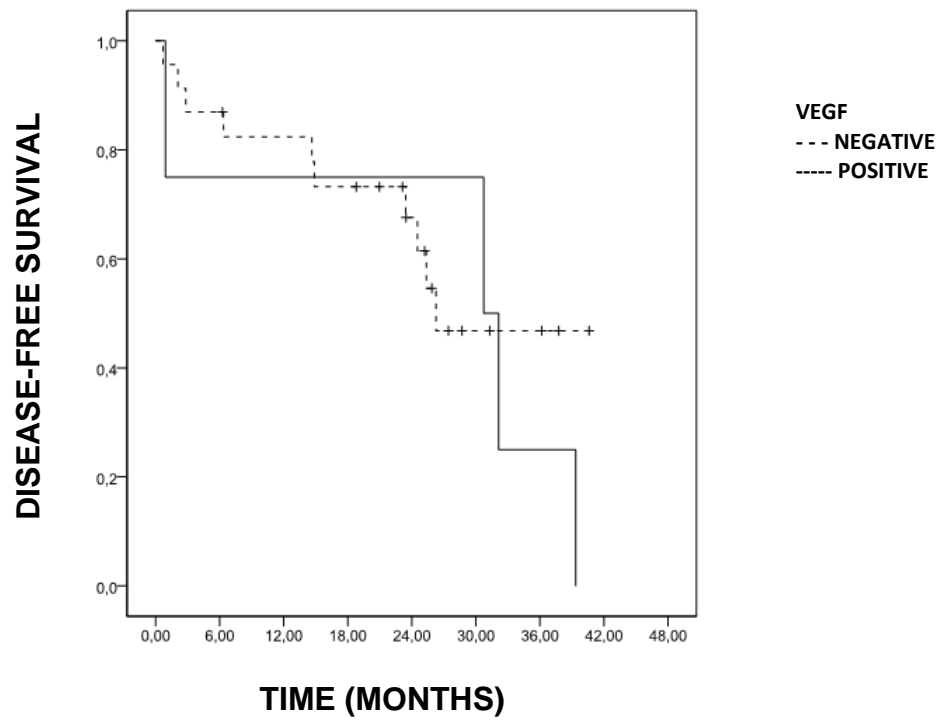
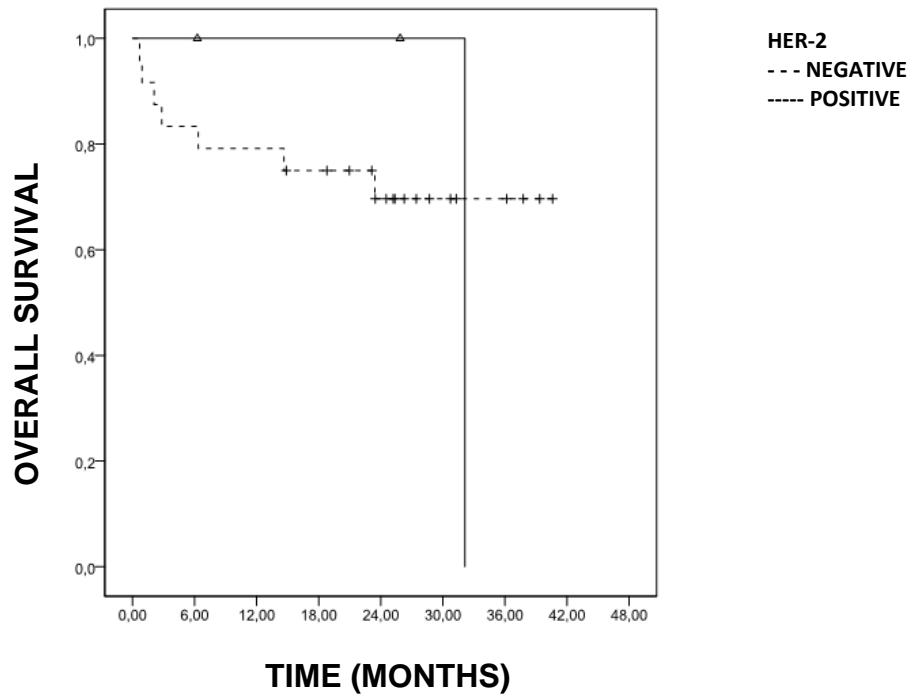


FIGURE 2

A



B

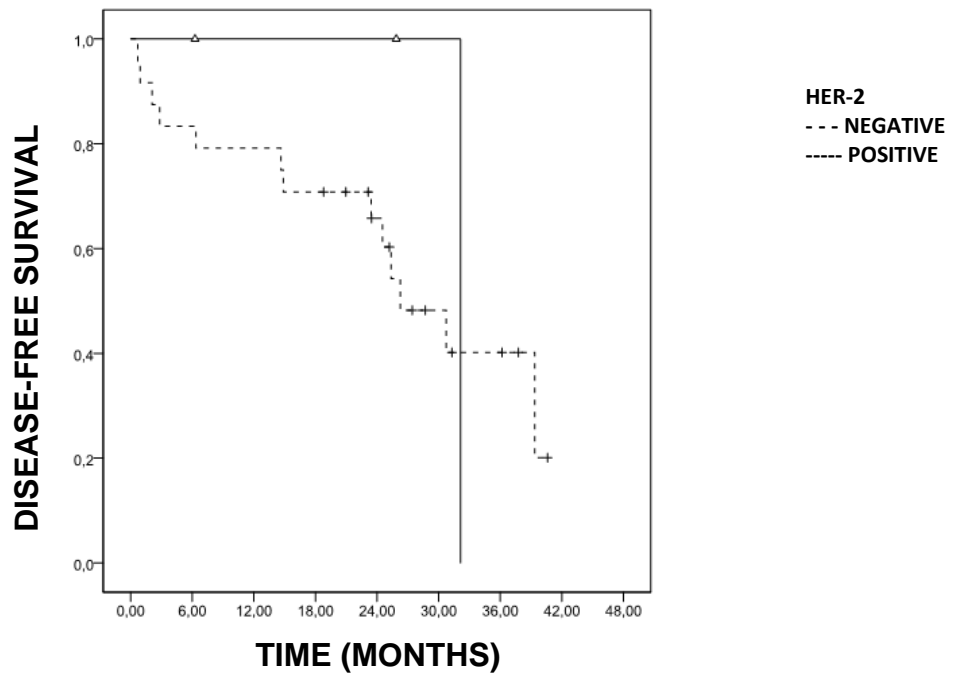
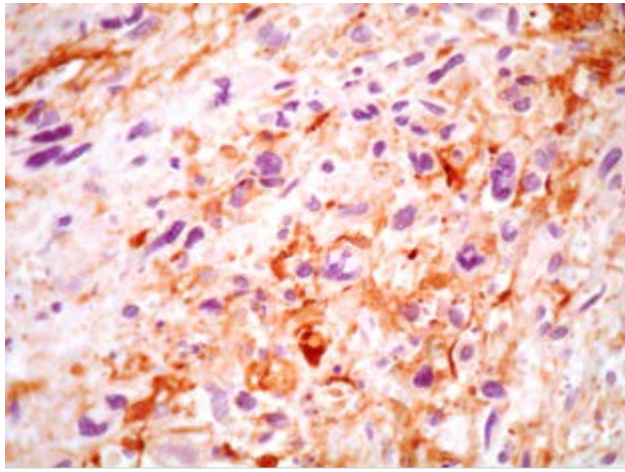
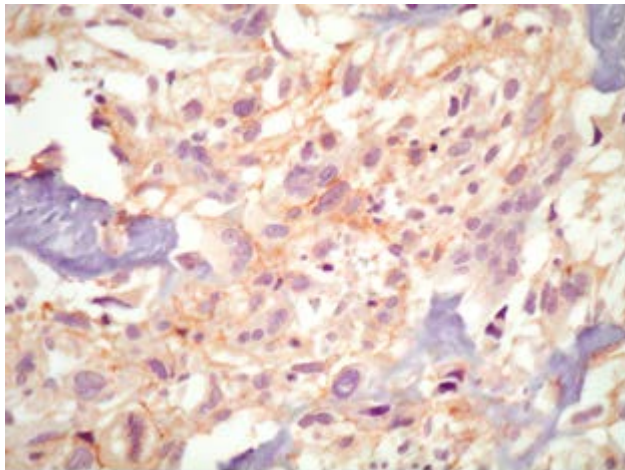


FIGURE 3



A



B